

Doktori értekezés tézisei

*Ozohánics Olivér*

# **Bioinformatikai és proteomikai módszerek fejlesztése és alkalmazása a glikoproteomikai kutatásokban**

Témavezető:

***Drahos László, Ph.D., tudományos főmunkatárs***

Magyar Tudományos Akadémia, Természettudományi Kutatóközpont, Szerves  
Kémiai Intézet



Kémia Doktori Iskola

A Doktori Iskola vezetője: Prof. Dr. Inzelt György

Szintetikus Kémia, Anyagtudomány és Biomolekuláris Kémia Doktori Program

A doktori program vezetője: Prof. Dr. Perczel András

Eötvös Loránd Tudományegyetem, Természettudományi Kar

Budapest, 2012

## Bevezetés

Az emberi génállomány feltérképezése, a genomika átütő sikere után a kutatók figyelme a fehérjék szekvenciájának, szerkezetének és funkcióinak megismerésének irányába fordult. Ez az új tudományterület proteomika néven vált ismertté. A proteomika, és az ezzel szoros kapcsolatban levő biomolekuláris tömegspektrometria világszerte a legdinamikusabban fejlődő kutatási irányok közé tartoznak; a kémiai-biokémiai kutatásokra fordított erőforrások jelentős és egyre növekvő hányada ebbe az irányba fókuszál. Az informatika és a műszerezettség párhuzamos fejlődése lehetővé teszi a tömegspektrometria rutinszerű felhasználását különböző biológiai minták vizsgálatára. Így lehetőség nyílt – többek között a legtöbbet vizsgált makromolekulák – a fehérjék mennyiségének, szekvenciájának és poszt-transzlációs módosulásainak meghatározására és jellemzésére.

A glikoziláció az emberi fehérjék egyik leggyakoribb poszt-transzlációs módosítása, amely számos biológiai folyamatban kulcsfontosságú szerepet játszik. A fehérjék glikozilációjának vizsgálata egyre nagyobb hangsúlyt kapott az elmúlt években: a glikoproteinek szerkezetének pontos ismerete hozzájárul számos biokémiai folyamat mélyebb megértéséhez. Ezek között szerepel a sejtek közötti kommunikáció és az immunfelismerés is, amelyek különböző betegségek kialakulásában meghatározó jelentőséggel bírnak. Az oligoszacharid struktúrák szerkezetében bekövetkező változások felismerése, azonosítása számottevő orvosi diagnosztikai jelentőséggel bír. Ezt jelzi az is, hogy az Egyesült Államok Élelmzési és Gyógyszerügyi Hivatala (FDA, Food and Drug Administration) által elfogadott tumor biomarkerek többsége glikoprotein. Mindemellett napjainkban egyre nagyobb számban jelennek meg bioszimiláris, fehérje alapú gyógyszer-molekulák, melyek a glikoziláció pontos jellemzése nélkül nem kerülhetnek forgalomba.

A genetikával és a proteomikával összehasonlítva a glikozilációval kapcsolatos ismereteink azonban még kezdeti stádiumban járnak. Ennek fő oka, hogy az oligoszacharid struktúrák szerkezetvizsgálata és analitikája a mai napig számos nehézséggel küzd. Az egyik legnagyobb probléma, hogy a glikoproteinek nagyszámú, de ugyanakkor kis koncentrációjú homológok, úgynevezett glikoformok formájában vannak jelen a szervezetben. Ezek szelektív dúsítására még nagy érzékenységű tömegspektrometria alkalmazása esetén is szükség van. Ugyanezen okból, más szerkezetvizsgálati módszerek kis érzékenységük miatt csak korlátozottan alkalmazhatók. Ezért fontos új dúsítási, mérési és értékelési módszerek kidolgozása. Bár a glikoziláció vizsgálatában a tömegspektrometria alapú módszerek meghatározóak, továbbfejlesztésük elengedhetetlen ahhoz, hogy a glikoziláció biokémiai folyamatokban és az élő szervezetben betöltött szerepének feltárásában jelentős előrelépés történjen.

## Célkitűzés

Doktori munkám kezdetekor a glikoziláció jellemzéséhez szükséges tömegspektrometriai módszerek csak részben álltak rendelkezésre. Mindez azonban soklépéses, hosszadalmas feladatot jelentett, még akkor is, ha a vizsgálandó glikoprotein nagy mennyiségben rendelkezésre állt. A tömegspektrometriás méréseket megfelelő számítógépes programok és (bio)informatikai háttér nélkül kellett értékelni, mely hosszú manuális munkát jelentett.

Munkám során célom volt egy olyan, tömegspektrometriás módszereken alapuló munkafolyamat kidolgozása, mely lehetővé teszi fehérjék helyspecifikus *N*-glikozilációjának vizsgálatát. A feladat része annak kidolgozása, hogy a módszer alkalmas legyen nagy áteresztőképességű vizsgálatokra – orvos-diagnosztikai feladatok megoldásánál ez ugyanis alapkövetelmény. Biológiai minták esetén komplex anyagkeverékekkel dolgozunk, ezért a folyamat minta-előkészítéssel kezdődik. Glikoproteinek minta-előkészítése esetén a cél részben ezek dúsítása, és több dúsítási módszer összehasonlításával a célra legmegfelelőbb technika kiválasztása.

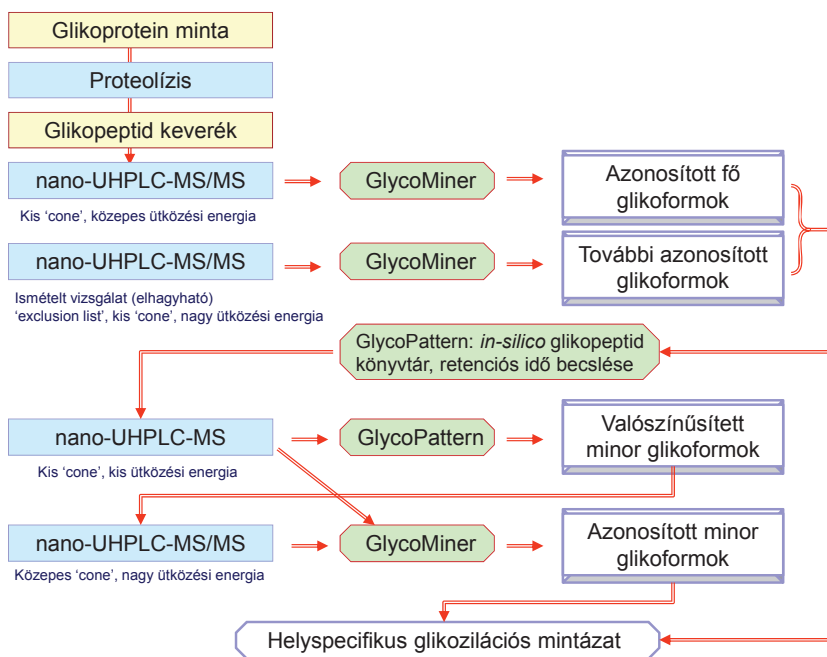
Ezt követően, munkám talán legfontosabb része a glikoproteinek szerkezetének jellemzése; ill. az erre szolgáló tandem tömegspektrometriás módszerek kidolgozása. A munka első lépése a vizsgált vegyületek fragmentációjának megértése. Ezt követően célunk volt az értékelés automatizálása, melyhez új számítógépes algoritmusok és programok kidolgozása szükséges. A fehérje glikoziláció heterogenitásának jellemzésére kombinált tömegspektrum/tandem tömegspektrum alapú munkafolyamat létrehozását terveztük, amely megbízható, pontos eredményt ad, és ugyanakkor széles körben elérhető.

Célom volt továbbá az így kidolgozott munkafolyamat segítségével a klinikai mintákból izolált fehérjeminták glikozilációjának jellemzése. Ennek segítségével lehetőség nyílik annak megállapítására, hogy van-e kapcsolat az adott betegség (érelmeszesedés) és a glikozilációs mintázat között.

## Kísérleti rész

### Fehérjék glikozilációs mintázatának meghatározása

Kísérletes munkám során standard fehérjék és klinikai mintákból (vérplazmából) izolált proteinek glikozilációs mintázatát határoztam meg. A glikoproteineket triptikus proteolízisnek vettem alá. Az így kapott peptideket és glikopeptideket nano-UHPLC-MS(/MS) módszerrel vizsgáltam, az alábbi ábrán bemutatott munkafolyamat szerint (1. ábra). A mérési eredmények MS/MS spektrumait az általam kidolgozott GlycoMiner és MS spektrumait a GlycoPattern számítógépes programokkal értékeltem ki.



1. ábra: A helyspecifikus glikozilációs mintázat meghatározásának folyamatábrája

## Eredmények és következtetések

Doktori munkám során helyspecifikus *N*-glikozilációs mintázat meghatározására alkalmas módszert dolgoztam ki és alkalmaztam különböző orvosi-diagnosztikai és analitikai problémák megoldására. A kidolgozott módszert atherosclerosis glikozilációs biomarkerek, valamint vérplazma fehérjék glikozilációs mintázatának meghatározására használtam, amelyet közvetlenül albumin depletált plazmából mértünk. Kidolgoztam továbbá a glikoproteinek dúsításának jellemzésére alkalmas mérőszámokat és vizsgáltam a glikozilációs mintázat dúsítás közben bekövetkező változását. Az elért tudományos eredményeket az alábbiakban foglalom össze:

- 1) Kidolgoztam egy nano-UHPLC-MS(/MS) alapú munkafolyamatot (1. ábra), amely alkalmas glikoproteinek helyspecifikus glikozilációjának meghatározására. A módszer legnagyobb előnye, hogy i) nem csak izolált glikoproteinek, hanem glikoprotein keverékek vizsgálatára is alkalmas, ii) kellően érzékeny kis mintamennyiségek vizsgálatára (1-10 pmol), így tényleges biológiai minták vizsgálatára használható, iii) nagy áteresztőképességű (azaz több száz minta vizsgálatára is alkalmazható). A munkafolyamat több – egymásra épülő – mérési folyamat és értékelés elvégzésén alapul. Tandem tömegspektrometriás mérést végeztem a mintában található fehérjék azonosítására (ezáltal szekvencia információkat nyertem), glikoproteinek glikozilációs helyeinek, vagyis a mintában található glikopeptid aminosav szekvenciájának meghatározására és normál tömegspektrometriai mérés segítségével nyertem a glikopeptid pontos arányát.
- 2) Kidolgoztam egy olyan számítógépes algoritmust és programot (GlycoPattern), amely az azonosított aminosav szekvenciák és retenciós idők alapján *in silico* összeállítja az elméletben lehetséges glikopeptid listáját. Ezt a program a kromatogramban jelen lévő glikopeptid relatív intenzitásarányának meghatározására használja fel. Az álpozitív találatok számát izotópeloszlás és kromatográfiás paramétereken alapuló szűrők alkalmazásával csökkentettem. A meghatározott intenzitások a mintában lévő glikoproteinek helyspecifikus glikozilációs mintázatát adják.
- 3) A glikopeptid szerkezetének, ill. összetételének tandem tömegspektrumuk alapján történő azonosítására algoritmust és számítógépes programot fejlesztettem ki (GlycoMiner). A tesztek alapján a program jól használható a glikopeptid azonosítására, mivel a GlycoMiner mindössze 0,1% álpozitív és 0,1% álnegatív hibával dolgozik, és zajos spektrumok esetében is jól használható. A GlycoMiner 100% pontossággal határozza meg a szerkezeteket azokban az esetekben, amelyekben a manuális kiértékelés is lehetséges. A program az MTA TTK

SZKI honlapjáról ingyenesen elérhető (<http://www.chemres.hu/ms/glycominer>). A dolgozat megírásáig több mint 150 felhasználó töltötte le.

- 4) A kidolgozott algoritmust és munkafolyamatot alkalmaztam glikoprotein standardok és vérplazma glikoproteinek glikozilációs mintázatának meghatározására. Módszerünk az első, amely a glikozilációs mintázat meghatározásakor nem csak az izotópeloszlást veszi figyelembe, hanem a fordított fázisú kromatográfiából nyerhető összes információt (retenció idő és kromatográfiás csúcs szélessége) is. A módszer nem igényel izolált fehérjéket, keverékek vizsgálatára is alkalmas. A módszer alkalmazhatóságát vérplazmából izolált fehérjék, pl. a haptoglobin, AGP glikozilációs mintázatának meghatározásával bizonyítottam.
- 5) Doktori munkám során megvizsgáltam három különböző dúsítási eljárást (fenilbórsav affinitást, búzacsíra agglutinin lektin affinitást és anioncserés módszereket) mind peptid, mind fehérje szinten. Az egyes frakciók glikopeptid tartalmának jellemzésére egy dúsítási indexet dolgoztam ki és alkalmaztam mindhárom dúsítási módszer frakcióira. Megállapítottam, hogy a peptidek dúsítása előnyösebb az alkalmazott protokollok esetén, valamint a három vizsgált módszer közül bórsav affinitás a legjobb glikopeptidek dúsítására.
- 6) A kidolgozott algoritmust alkalmaztam atherosclerosis biomarkerek meghatározására. Munkám során egészséges, valamint atherosclerosisban szenvedő betegek esetében meghatároztam az AGP helyspecifikus glikozilációs mintázatát. Pozitív kontrollként aneurizmában szenvedő betegek glikozilációs mintázatát használtam. Megállapítottam, hogy az AGP helyspecifikus glikozilációs mintázatának vizsgálatával egy igen jó, 89%-os predikciós mutatóval rendelkező potenciális biomarkert azonosítottam, amely alkalmas az atherosclerosisos megbetegedés előrejelzésére. Ez alátámasztja, hogy az általam kidolgozott minta-előkészítési és analitikai módszerek, valamint a GlycoMiner program alkalmazásának nemcsak elméleti, hanem komoly gyakorlati jelentősége is van. Segítségükkel kis mennyiségű fehérjemintából (pl. 10 pmol AGP esetén) is lehetőség van különböző glikopeptidek azonosítására, és a glikozilációs mintázat különbségeinek meghatározására. A glikopeptid mintázat sok esetben alkalmas arra, hogy egészséges és beteg csoportok, valamint pozitív kontrollcsoportok között különbséget tudjunk tenni, azaz különböző patológiás állapotokat előre tudjunk jelezni.

## Publikációk

### **A Ph.D. értekezésben felhasznált, referált tudományos folyóiratokban megjelent közlemények**

1. Ozohanics, O., Krenyacz, J., Ludanyi, K., Pollreis, F., Vekey, K., and Drahos, L. (2008) GlycoMiner: a new software tool to elucidate glycopeptide composition. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 22, 3245-3254. IF: 2.846
2. Ozohanics, O., Turiak, L., Drahos, L., and Vekey, K. (2012) Comparison of glycopeptide/glycoprotein enrichment techniques. *Rapid communications in mass spectrometry* 26, 215-217. IF: 2.846
3. Ozohanics, O., Turiák, L., Puerta, A., Drahos, L., and Vékey, K. (2012) HPLC-MS methodology for analyzing site-specific glycosylation patterns. *Journal of Chromatography A*. IF: 4.194 (közlésre elküldve)

### **Referált tudományos folyóiratokban megjelent egyéb közlemények**

1. Turiak, L., Ozohanics, O., Marino, F., Drahos, L., and Vekey, K. (2011) Digestion protocol for small protein amounts for nano-HPLC-MS(MS) analysis. *Journal of Proteomics* 74, 942-947. IF: 5.074
2. Turiak, L., Misjak, P., Szabo, T. G., Aradi, B., Paloczi, K., Ozohanics, O., Drahos, L., Kittel, A., Falus, A., Buzas, E. I., and Vekey, K. (2011) Proteomic characterization of thymocyte-derived microvesicles and apoptotic bodies in BALB/c mice. *Journal of Proteomics* 74, 2025-2033. IF: 5.074
3. Ambrus, A., Torocsik, B., Tretter, L., Ozohanics, O., and Adam-Vizi, V. (2011) Stimulation of reactive oxygen species generation by disease-causing mutations of lipoamide dehydrogenase. *Human Molecular Genetics* 20, 2984-2995. IF: 8.058

4. Zsoldos-Mady, V., Ozohanics, O., Csampai, A., Kudar, V., Frigyes, D., and Sohar, P. (2009) Ferrocenyl pyrazolines: Preparation, structure, redox properties and DFT study on regioselective ring-closure. *Journal of Organometallic Chemistry* 694, 4185-4195. IF: 2.205
5. Budai, L., Ozohanics, O., Ludanyi, K., Drahos, L., Kremmer, T., Krenyacz, J., and Vekey, K. (2009) Investigation of genetic variants of alpha-1 acid glycoprotein by ultra-performance liquid chromatography-mass spectrometry. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 393, 991-998. IF: 3.841
6. Budai, L., Pollreis, F., Ozohanics, O., Ludanyi, K., Drahos, L., and Vekey, K. (2008) Analysis of complex oligosaccharides using graphitized carbon liquid chromatography/mass spectrometry. *European Journal of Mass Spectrometry* 14, 419-422. IF: 1.34

### **Tudományos konferencián tartott előadások és posztterek**

1. Ozohanics, O., Krenyacz, J., Pollreis, F., Vékey, K., Drahos, L.: *Automatic identification of saccharides and glycopeptides in MS/MS*, 25<sup>th</sup> Informal Meeting on Mass Spectrometry; Nyíregyháza-Sóstó, 2007. május 6-10. (előadás)
2. Ozohanics, O., Krenyacz, J., Budai, L., Ludányi, K., Kremmer, T., Vékey, K., Drahos, L.: *Analysis of genetic variants of  $\alpha$ -1 acid glycoprotein in cancer*, Second Central and Eastern European Proteomic Conference; Jéna, 2008. október 12-15. (plenáris előadás)
3. Ozohanics, O., Krenyacz, J., Budai, L., Ludányi, K., Kremmer, T., Vékey, K., Drahos, L.: *Az  $\alpha$ -1 savas glikoprotein genetikai variánsainak vizsgálata*, Elvásztástudományi Vándorgyűlés 2008; Sárovar, 2008. november 5-7. (előadás)
4. Ozohanics, O., Drahos, L., Vékey, K.: *Glycosylation, mass spectrometry and informatics*, 3<sup>rd</sup> Central and Eastern European Proteomics Conference; Budapest, 2009. október 6-9. (előadás)
5. Ozohanics, O., Memboeuf, A., Indelicato, S., Drahos, L., Vékey, K.: *Size dependence of fragmentation – predictable or mysterious?*, 28<sup>th</sup> Informal Meeting on Mass Spectrometry; Kőszeg, 2010. május 2-6. (előadás)



6. Ozohanics, O., Turiák, L., Lengyel, Á., Vékey, K., Drahos, L.: *Glycosylation Patterns and Glycopeptide Biomarkers*, 5<sup>th</sup> Central and Eastern European Proteomic Conference; Prága, 2011. szeptember 19-22. (előadás)
7. Ozohanics, O., Turiák, L., Lengyel, Á., Vékey, K., Drahos, L.: *A Challenge for nanoUPLC-MS/MS: Determination of Glycosylation Patterns*, HPLC 2011; Budapest, 2011. június 19-23. (előadás)
8. Ozohanics, O., Pollreis, F., Gráf, L., Vékey, K.: *Intact protein analysis of crayfish trypsin variants*, 27<sup>th</sup> Informal Meeting on Mass Spectrometry; Retz, 2009. május 3-6. (poszter)
9. Ozohanics, O., Vékey, K., Drahos, L.: *Kinetic characterization of the Golgi protein glycosylation pathway*, 3<sup>rd</sup> EuPA Congress Clinical Proteomics; Stockholm, 2009. június 14-17. (poszter)
10. Turiák, L., Ozohanics, O., Buzás, E., Vékey, K.: *Mass spectrometric analysis of T-cell derived membrane vesicle proteins*, 3<sup>rd</sup> Central and Eastern European Proteomics Conference; Budapest, 2009. október 6-9. (poszter)
11. Turiák, L., Ozohanics, O., Misják, P., Buzás, E., Vékey, K.: *Determination and quantification of proteins originating from activated T-cell derived membrane vesicles by mass spectrometry*, 25<sup>th</sup> International Symposium on Microscale BioSeparations MSB 2010; Prága, 2010. március 21-25. (poszter)
12. Ozohanics, O., Vékey, K., Drahos, L.: *N-glycosylation kinetics model*, 4th Summer School on Mass Spectrometry in Biotechnology and Medicine; Dubrovnik, 2010. július 4-10. (poszter)
13. Ozohanics, O., Turiák, L., Drahos, L., Vékey, K.: *Glycoprotein and glycopeptide enrichment methods on human plasma samples*, 4<sup>th</sup> European Conference on Chemistry for Life Sciences; Budapest, 2011. augusztus 31 - szeptember 3. (poszter)